

University of Groningen

B cell kinetics

Deenen, Gerrit Jan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1993

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Deenen, G. J. (1993). *B cell kinetics*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Het afweersysteem (immuunsysteem) in mens en dier zorgt voor bescherming tegen schadelijke agentia zoals bacteriën en virussen. Een van de kenmerken van het afweersysteem is de productie van antilichamen (immuunglobulines). Cellen van het immuunsysteem die gespecialiseerd zijn om antilichamen te maken worden B lymfocyten of B cellen genoemd en ontstaan op volwassen leeftijd voornamelijk in het beenmerg. Deze B lymfocyten hebben immuunglobulines (Ig) aan hun oppervlakte, die specifiek met een bepaald antigeen kunnen binden. Na stimulatie met een antigeen differentiëren de B lymfocyten tot plasmacellen die grote hoeveelheden Ig uitscheiden.

In het beenmerg vindt, via een continu proces van proliferatie en differentiatie van B cel voorloperstadia (precursors), de vorming plaats van onrijpe B lymfocyten. Deze onrijpe B lymfocyten worden "newly-formed" (NF)-B cellen worden genoemd. De directe precursors van de NF-B cellen zijn de pre-B cellen die op hun beurt weer ontstaan uit pro-B cellen. De NF-B cellen verlaten vervolgens het beenmerg waarna ze zich in de periferie (o.a. in de milt) ontwikkelen tot rijpe B lymfocyten.

Uit onderzoek in muizen is bekend, dat het aantal NF-B cellen, dat dagelijks in het beenmerg geproduceerd wordt, voldoende is om alle rijpe B lymfocyten binnen een paar dagen te vervangen. Het is echter gebleken, dat het merendeel van de B lymfocyten in de periferie een levensduur heeft van 2-3 maanden. Dit betekent dat maar een klein gedeelte van de NF-B lymfocyten uit het beenmerg bijdraagt aan de totstandkoming dan wel het instandhouden van de pool van rijpe B lymfocyten.

Het doel van de studies in dit proefschrift was om meer informatie te verkrijgen omtrent de kinetiek van B cel precursors, NF-B cellen en rijpe B lymfocyten in de rat. Deze informatie is belangrijk om mechanismen, die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling, selectie en het instandhouden van het B cel repertoire, beter te begrijpen.

De kinetiek is onderzocht door de delings-activiteit de van B cel precursors en de snelheid waarmee NF-B cellen worden gevormd in het beenmerg te bepalen. Vervolgens is gekeken naar de snelheid waarmee een aantal B lymfocyten subsets in de periferie worden vervangen. Op grond van al deze gegevens is het mogelijk om de productie in het beenmerg (medullair) en de vervanging in de periferie (extramedullair) te kwantificeren. De productie en vervangingsdata laten zien waar tijdens de ontwikkeling van B lymfocyten, vanaf het pro-B cel stadium tot de rijpe B lymfocyt, celverlies (= celdood) optreedt.

In hoofdstuk 2 zijn, met behulp van antilichamen tegen bepaalde cel merkers, een aantal B cel precursor stadia gekarakteriseerd. Op grond van de expressie van B220 glycoproteïne (leucocyte common antigen (LCA, CD45)), het enzym terminaal deoxynucleotidyl transferase (TdT) en van Ig zware (H) en lichte (L) ketens is het mogelijk om pro-B cellen, pre-B cellen en NF-B cellen van elkaar te onderscheiden. Pro-B cellen (B220⁺Ig⁻) zijn nog verder te verdelen in TdT⁻ en TdT⁺ pro-B cellen. Pre-B cellen worden gekenmerkt doordat ze wel al μ H ketens in hun

cytoplasma hebben maar nog geen L ketens. De pro-B cellen en de pre-B cellen kunnen op grond van hun cel diameter worden onderscheiden in kleine en grote cellen. De celdelingsactiviteit is bepaald van alle deze precursor populaties en van de NF-B cellen in het beenmerg. Er is gevonden dat celdelingsactiviteit voornamelijk voorkomt in de grote B cel precursors en dat de kleine B cel precursors en de NF-B cellen niet delen. Met behulp van de delingssnelheid van de grote pro- en pre-B cellen is bepaald hoeveel cellen er in het beenmerg geproduceerd (*productie*) worden: grote pro-B cellen produceren 330 miljoen cellen per dag en grote pre-B cellen 320 miljoen cellen per dag.

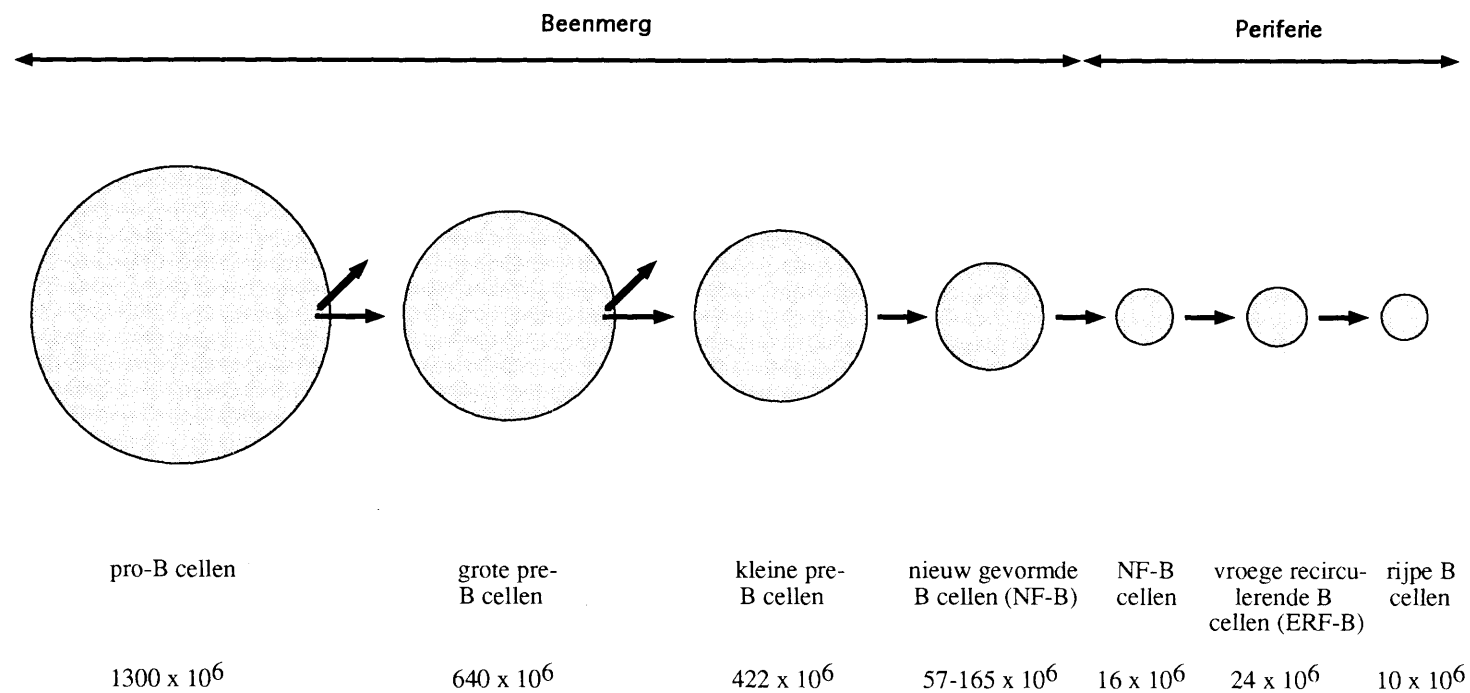
Omdat kleine pro- en pre-B cellen en NF-B cellen zelf niet meer delen hebben is in hoofdstuk 3 gemeten hoe snel deze niet-delende cellen worden vervangen door hun precursors. Het totaal aantal cellen dat in het beenmerg per dag in elke (niet delende) cel populatie wordt vervangen is vervolgens berekend (*vervanging*). De belangrijkste conclusie in deze studie is dat per dag 422 miljoen kleine pre-B cellen en 165 miljoen NF-B cellen worden vervangen.

De gegevens van hoofdstukken 2 en 3 tesamen laten zien dat er veel cellen worden geproduceerd in de B cel precursor compartimenten (650 miljoen/dag) terwijl er uiteindelijk maar 165 miljoen/dag NF-B cellen worden. Het meeste celverlies werd waargenomen tijdens de differentiatie van kleine pre-B cellen naar NF-B cellen. Tijdens deze overgang, die optreedt zonder verdere celdeling, vinden er in de kleine pre-B cel een tweetal processen plaats die het grote celverlies kunnen verklaren: i) de herrangschikking van de L keten genen die niet resulteert in de productie van lichte ketens, ii) er vindt geen associatie plaats van de μ H en L ketens die leidt tot een compleet Ig molecuul. Tevens kan er deletie optreden van auto-reactieve NF-B cellen direct nadat deze hun Ig moleculen aan het oppervlakte hebben gebracht.

De NF-B cellen in het beenmerg verlaten uiteindelijk dit orgaan en migreren via de bloedbaan naar de milt. Om te bepalen welk gedeelte van de NF-B cellen uit het beenmerg worden opgenomen in de perifere pool van lang-levende B cellen, is de vervangingssnelheid in hoofdstuk 4 bepaald van Thy-1⁺ en Thy-1⁻ B cellen in het beenmerg, bloed, milt en lymfeklieren. Thy-1⁺ B cellen worden beschouwd als onrijpe B cellen terwijl Thy-1⁻ B cellen worden gezien als rijpe B cellen. Het aantal Thy-1⁺ en Thy-1⁻ B cellen die per dag worden vernieuwd in elk orgaan is vervolgens berekend. Gebaseerd op deze gegevens concluderen we dat er celverlies optreedt tijdens de overgang van Thy-1⁺ B cellen van het beenmerg naar de periferie en wanneer Thy-1⁺ B cellen in de periferie uitrijpen tot Thy-1⁻ B cellen. In deze studie is ook aangetoond dat in de rat ongeveer 22% van alle in de milt aanwezige B cellen "kort-levend" zijn en dat deze kort-levende B cellen Thy-1⁺ zijn. Daarmee is, althans in de rat, de controverse opgelost omtrent de verhouding van kort-levende en lang-levende B cellen in perifere lymfoïde organen.

Op ons laboratorium is onlangs aangetoond dat niet alle Thy-1⁺ (onrijpe) B cellen in de periferie het zelfde fenotype hebben maar op basis van hun expressie van IgM en IgD onderscheiden kunnen worden in twee B cel subpopulaties. De ene B cel subpopulatie heeft als fenotype,

Fig.1. Flow Van Cellen Tijdens De B cel Ontwikkeling In Beenmerg En Periferie Van De Rat



Dit schema geeft weer hoeveel cellen per dag in het beenmerg worden gevormd door B cel precursors en hoeveel cellen uiteindelijk per dag nodig zijn in het rijpe perifere B cel compartiment. Tevens laat dit schema duidelijk zien wanneer tijdens de B cel ontwikkeling celverlies optreedt.

Thy-1⁺IgM^{hi}IgD^{lo} en wordt alleen in het beenmerg, bloed en in de milt gevonden en deze B cellen zijn de typische NF-B cellen. De andere B cel subpopulatie heeft als fenotype, Thy-1⁺IgM^{lo}IgD^{hi} en wordt de "early recirculating follicular" (ERF)-B cel genoemd. NF-B cellen in de periferie zijn de voorlopers van de ERF-B cellen die op hun beurt weer de voorlopers zijn van de rijpe (Thy-1⁻) B cellen. In hoofdstuk 5 is de kinetiek bepaald van beide Thy-1⁺ subpopulaties in de milt. Het bleek dat, hoewel beide snel vervangen worden, NF-B cellen een hogere vervangingssnelheid hebben dan de ERF-B cellen. Aan de hand van deze vervangings-snelheden en op grond van de waarneming dat beide cel populaties (NF-B en ERF-B) niet delend zijn, is geschat hoeveel perifere NF-B cellen en ERF-B cellen in het gehele dier worden vervangen. De conclusie hiervan is dat celverlies voornamelijk plaatsvindt tussen het moment dat NF-B cellen het beenmerg verlaten en in bloed en milt worden waargenomen. Er vindt nauwelijks celverlies meer plaats tijdens de overgang van perifere NF-B cellen naar ERF-B cellen en tijdens de overgang ERF-B cellen naar Thy-1⁻ B cellen.

Op grond van de gegevens van hoofdstukken 4 en 5 concluderen we dat tijdens de differentiatie van NF-B cellen in het beenmerg naar rijpe Thy-1⁻ B cellen in de periferie maar 20% van de dagelijkse geproduceerde NF-B cellen geïncorporeerd wordt in de perifere pool van lang-levende B cellen. Aangezien bekend is dat in muizen lang-levende IgM^{lo}IgD^{hi} perifere B cellen een sterk geselecteerd Vh gen repertoire tot expressie brengen, kan in de rat dit grote celverlies mogelijk verklaard worden door selectie van B cellen.

In mensen en muizen wordt een speciale subset B cellen waargenomen die B-1 cellen worden genoemd. Deze relatief kleine subset van B-1 cellen (vroeger ook wel CD5 B cellen of Ly-1 B cellen genoemd) heeft specifieke eigenschappen. In ratten is het bestaan van B-1 cellen nog niet onomstotelijk bewezen. Om een eventuele bijdrage van B-1 cellen aan de B cel kinetiek te bestuderen is in muizen de delingsactiviteit en vervangingssnelheid van B-1 cellen bepaald (hoofdstuk 6). De resultaten laten zien dat de vervanging van B-1 cellen niet anders is dan de vervanging van de conventionele B cellen (in beide gevallen ~ 1%/dag). Zo er al B-1 cellen in de rat aanwezig zijn is hun eventuele bijdrage aan de vervanging van het totaal van perifere B cellen niet significant groot.

Al deze kinetische gegevens verkregen in hoofdstukken. 2-6 hebben geleid tot een kinetisch model voor B cel dynamiek in beenmerg en periferie van de rat (hoofdstuk 7) (Fig. 1). Op basis van dit model is vastgesteld dat tijdens de ontwikkeling van B lymfocyten (vanaf het pro-B cel stadium in het beenmerg tot aan het rijpe Thy-1⁻ B cel stadium in de periferie) op twee plaatsen verlies van cellen kan optreden. Ten eerste: celverlies tijdens de vorming van B lymfocyten in het beenmerg. Dit celverlies kan grotendeels verklaard worden door niet productieve Ig gen herrangschikkingen. Ten tweede treedt celverlies op wanneer maar een deel van alle in het beenmerg gevormde B cellen wordt geïncorporeerd in de pool van lang-levende rijpe B cellen. Het is waarschijnlijk dat selectie mechanismen hier een grote rol in spelen. Het kinetisch model laat ook zien dat uiteindelijk maar ongeveer 3% van alle in het beenmerg geproduceerde voorloper B cellen wordt opgenomen in de pool van rijpe B cellen (Fig. 1).